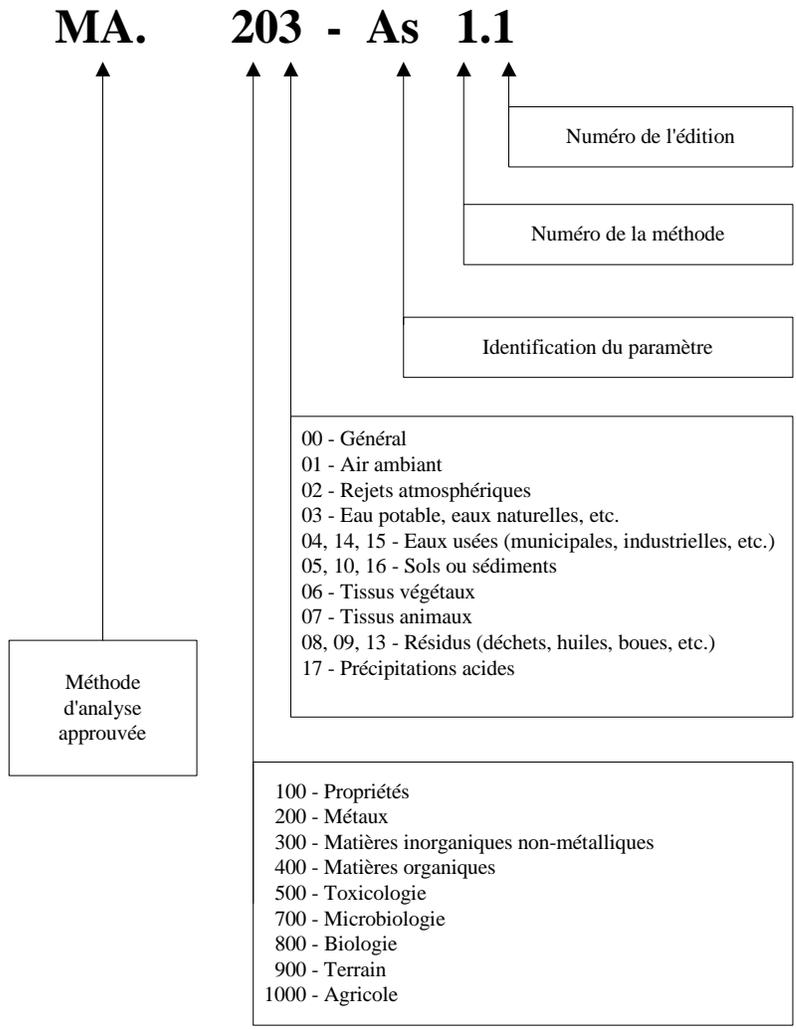


MA. 700 – Fec.Ec 1.0
Édition : 2003-12-05

Méthode d'analyse

Recherche et dénombrement des coliformes fécaux
(thermotolérants) et confirmation à l'espèce *Escherichia coli* : méthode par filtration sur membrane

Exemple de numérotation :



Historique de la méthode

Cette méthode a été implantée dans les laboratoires du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec pour effectuer la recherche et le dénombrement des coliformes fécaux (thermotolérants) et la confirmation à l'espèce *Escherichia coli* dans les échantillons solides et liquides. La première étape de la méthode utilise la technique des membranes filtrantes et elle correspond à la méthode de 1998 numéro 9222D de l'American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, intitulée « Fecal Coliform Membrane Filter Procedure », incluse au manuel de référence *Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater*. L'étape facultative de confirmation des colonies à l'espèce *Escherichia coli* est une procédure originale élaborée et validée par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec.

Cette méthode annule et remplace la méthode *Recherche et dénombrement des coliformes fécaux – Méthode par filtration sur membrane* (MA. 700 – Fec 1.0), qui avait été publiée en avril 2000. La procédure contenue dans la méthode actuelle n'est pas différente de celle de l'ancienne méthode MA. 700 – Fec 1.0. Cependant, cette nouvelle méthode se justifie par l'ajout au texte de l'idée que les coliformes fécaux confirmés selon la procédure de confirmation de cette méthode sont en fait des bactéries de l'espèce *Escherichia coli*. Quelques autres modifications mineures sont également ajoutées dans ce texte.

Reproduction et traduction, même partielles, interdites sans l'autorisation du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, ministère de l'Environnement du Québec.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (thermotolérants) et confirmation à l'espèce *Escherichia coli* Méthode par filtration sur membrane. MA. 700 – Fec.Ec 1.0,
Ministère de l'Environnement du Québec, 2003, 23 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
1. DOMAINE D'APPLICATION	8
2. PRINCIPE ET THÉORIE	8
3. FIABILITÉ	8
3.1. Interférence	8
3.2. Limite de détection	9
3.3. Limite de quantification	9
3.4. Fidélité	9
3.5. Sélectivité	10
3.6. Spécificité	10
3.7. Pourcentage de récupération	10
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	10
5. APPAREILLAGE	11
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	12
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	15
7.1. Préparation des échantillons	15
7.2. Analyse de l'échantillon	16
7.3. Observation des résultats	17
7.4. Confirmation	17
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	19
8.1. Échantillons d'eau potable, d'eau de surface et d'eaux usées	19
8.2. Échantillons solides (boues, sols et déchets)	19
8.3. Dénombrement à l'intérieur des limites de quantification	20
8.4. Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification	20
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	22
10. BIBLIOGRAPHIE	22
Figure 1 - Schéma du protocole de confirmation des colonies de coliformes fécaux à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	23

INTRODUCTION

Les coliformes fécaux se définissent comme des bactéries aérobies et anaérobies facultatives, à Gram négatif, asporulées, en forme de bâtonnet et produisant des colonies bleues en moins de 24 heures à 44,5 °C sur un milieu de type m-Fc contenant du lactose. En raison de leur capacité de croître à la température élevée de 44,5 °C et non seulement à 35 °C comme les coliformes totaux, les coliformes fécaux sont de plus en plus souvent désignés par l'appellation « coliformes thermotolérants » dans la littérature scientifique.

Les coliformes fécaux qui produisent une réaction négative à l'épreuve de la cytochrome-oxydase, une réaction positive au test de l'ONPG (ortho-nitrophényl-β-D-galactopyranoside) et une réaction positive au test de MUG (4-méthyl-umbélliféryl-β-D-glucuronide) appartiennent à l'espèce bactérienne *Escherichia coli*. Dans le contexte de cette méthode, les « coliformes fécaux confirmés » sont en réalité des *E. coli*.

L'utilité et la fidélité de ce paramètre comme indicateur de pollution par des matières fécales sont généralement mises en évidence par les faits suivants :

- la densité des coliformes fécaux et de *E. coli* est généralement proportionnelle au degré de pollution produite par les matières fécales;
- si des bactéries pathogènes d'origine intestinale sont présentes, il y a également des coliformes fécaux et la bactérie *E. coli*, ces derniers étant généralement en plus grand nombre que les bactéries pathogènes;
- les coliformes fécaux et l'*E. coli* sont toujours présents dans l'intestin des humains et des animaux à sang chaud et ils sont éliminés en grande quantité dans les matières fécales;
- la survie des coliformes fécaux et de *E. coli* dans l'environnement est généralement équivalente à celle des bactéries pathogènes et elle est habituellement inférieure à celle des coliformes totaux;
- les coliformes fécaux et l'*E. coli* sont habituellement sans risque pour les humains et ils peuvent être dénombrés par des techniques de laboratoire relativement simples.

Les coliformes fécaux de même que l'*E. coli* sont des indicateurs d'une contamination récente ou constante, d'origine fécale humaine ou animale. *E. coli* est un indicateur plus spécifique d'une contamination fécale que le groupe des coliformes fécaux.

Les principales sources environnementales de coliformes fécaux et de *E. coli* sont les rejets d'eaux usées domestiques et municipales et parfois industrielles. Les activités agricoles reliées à l'épandage ou à l'entreposage des fumiers et des lisiers peuvent être à l'origine de pollution microbiologique. C'est d'ailleurs pour cette raison que les coliformes fécaux et l'*E. coli* sont utilisés fréquemment dans la réglementation et les suivis environnementaux (ex. : eau potable, eaux de baignade, eaux usées, etc.).

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode permet de dénombrer les coliformes fécaux par filtration sur membrane, puis de confirmer leur appartenance à l'espèce *E. coli*. Elle s'applique aux eaux usées, aux eaux souterraines, aux eaux de surface et aux eaux de consommation. Les échantillons de sols, de boues, de déchets solides et de sédiments peuvent également être analysés par cette méthode si la concentration suspectée en coliformes fécaux ou en *E. coli* est supérieure à 10 UFC/g d'échantillon humide (unité formant des colonies).

Les coliformes fécaux ainsi que l'*E. coli* sont utilisés comme indicateur de la présence possible de microorganismes pathogènes.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

La méthode de filtration sur membrane consiste à recueillir, identifier et dénombrer les bactéries recherchées dans un échantillon à la surface d'une membrane filtrante stérile. Les eaux usées doivent faire l'objet de dilutions et les solides sont mis en suspension et dilués dans un tampon phosphate. La méthode consiste à filtrer, à travers une membrane de porosité de 0,45 µm, un volume déterminé de l'échantillon et d'incuber ensuite cette membrane pendant 24 heures ± 2 heures à 44,5 °C ± 0,2 °C sur le milieu m-Fc. Dans ces conditions, les coliformes fécaux forment des colonies bleues qui permettent une numération et une identification présomptive. L'identification des coliformes fécaux à l'espèce *E. coli* est confirmée par une réaction négative à l'épreuve de la cytochrome-oxydase, une réaction positive au test de l'ONPG (ortho-nitrophényl-β-D-galactopyranoside) et une réaction positive à l'épreuve du MUG (4-méthyl-umbélliféryl-β-D-glucuronide).

La présence de sels biliaires dans le milieu m-Fc inhibe la croissance de la majorité des organismes à Gram positif ainsi que celles des microorganismes sporulants. De même, le sel de sodium de l'acide rosolique inhibe la croissance d'une variété de bactéries non coliformes. La formation de colonies bleues résulte de la réaction d'un produit de la fermentation du lactose par les bactéries avec le colorant aniline bleu du milieu de culture.

3. FIABILITÉ

3.1. INTERFÉRENCE

Les bouteilles d'échantillonnage de 250 ml remplies à pleine capacité ne permettent pas d'agiter l'échantillon et de disperser uniformément les bactéries présentes dans tout le volume initial. Le rejet d'une portion de l'échantillon au laboratoire risquerait de modifier la concentration initiale des bactéries par unité de volume de l'échantillon et de fausser le résultat. L'analyse de tels échantillons doit faire l'objet d'une remarque à cet effet dans le rapport d'analyse.

La présence de matières en suspension (alumine, argile, substances ferrugineuses, etc.) peut nuire à la filtration en colmatant la membrane. Les matières en suspension accumulées sur la membrane peuvent également entraver l'observation des colonies en masquant ou en inhibant la

croissance des coliformes fécaux et de *E. coli*. L'utilisation de plusieurs membranes est alors indiquée afin de filtrer le volume d'échantillon requis. La technique de fermentation en tubes multiples (TFTM) doit être utilisée si l'emploi de plusieurs membranes ne constitue pas une solution valable pour remédier à ces interférences.

La gélose m-Fc doit être conservée à 4 °C à l'abri de la lumière pendant une période d'entreposage maximale de deux semaines. Une période d'entreposage prolongée peut conduire à une diminution appréciable de la sélectivité et du rendement de ce milieu.

Les bactéries ne doivent pas être en suspension dans l'eau de dilution pendant plus de 30 minutes à la température ambiante, car il peut en résulter une variation de la population initiale.

Les boîtes de Pétri doivent être mises en incubation dans un délai maximal de 30 minutes après la filtration car la température d'incubation est un facteur important de sélectivité de la méthode.

Certains genres bactériens tels que *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* peuvent croître occasionnellement sur le milieu m-Fc à 44,5 °C et produire des colonies bleues caractéristiques des coliformes fécaux. Cependant, celles-ci ne produisent pas de réactions positives au MUG. Cette situation est fréquente avec des échantillons provenant de boues et d'eaux usées de papetières ainsi que de composts à base de végétaux.

3.2. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection pour cette méthode est de 1 UFC (unités formant des colonies) par volume ou dilution filtré.

3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

Les limites de quantification pour cette méthode se situent entre 20 et 60 UFC de coliformes fécaux. Le nombre total de colonies de toutes sortes doit être inférieur à 200 par membrane. De plus, lorsqu'il y a une croissance abondante d'organismes, spécifique ou non, le résultat peut être non quantifiable. Le résultat est alors rapporté de la façon suivante :

TNI : colonies trop nombreuses pour être identifiées.

3.4. FIDÉLITÉ

3.4.1. Répliquabilité

La répliquabilité d'une série de mesures (n = 10) est de ± 8 UFC/100 ml à une concentration de 54 UFC/100 ml, de ± 60 UFC/100 ml à une concentration de 380 UFC/100 ml et de $\pm 4\ 000$ UFC/100 ml à une concentration de 21 000 UFC/100 ml en coliformes fécaux.

3.4.2. Répétabilité

La répétabilité d'une série de mesures (n = 10) est de $\pm 4\ 000$ UFC/100 ml à une concentration de 21 000 UFC/100 ml en coliformes fécaux.

3.5. SÉLECTIVITÉ

L'observation de 742 colonies typiques et de 381 colonies atypiques sur les géloses m-Fc indique un indice de sélectivité égal à 0,66 pour ce milieu lors de l'analyse de 32 échantillons.

La sélectivité d'un milieu augmente lorsque cet indice se rapproche de l'unité (1).

3.6. SPÉCIFICITÉ

L'erreur causée par la présence de faux positifs résulte de la numération présomptive et erronée des colonies bleues identifiées comme étant des *E. coli* et provenant de 98 colonies présumées typiques prélevées sur des échantillons filtrés de différentes natures (eaux salées, eaux de surface et eaux usées).

L'identification biochimique indique que 11 colonies sur 98 colonies bleues isolées ne sont pas des *E. coli*. Le facteur 1 de l'indice de spécificité ou erreur de faux positifs est donc de $11/98 = 0,11$.

L'erreur causée par la présence de faux négatifs est liée à la croissance de colonies d'apparence atypique et qui sont en réalité des *E. coli*. L'identification biochimique montre que 11 colonies atypiques sont des *E. coli*. Le facteur 2 de l'indice de spécificité ou erreur reliée aux faux négatifs est donc de 0,11 (11 colonies cibles atypiques non décelées divisées par la somme de 87 colonies cibles typiques décelées et de 11 colonies cibles atypiques non décelées).

L'indice de spécificité est donc de 0,22 en additionnant les facteurs 1 et 2. La spécificité d'un milieu de culture augmente lorsque l'indice approche de 0.

3.7. POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION

Le pourcentage de récupération a été établi à partir d'une souche de référence (*E. coli*) dont la numération a été réalisée sur un milieu non sélectif incubé à 44,5 °C. Les bactéries ont été mises en suspension dans des échantillons environnementaux stérilisés et stabilisés à 4 °C pendant 24 heures.

Les pourcentages de récupération mesurés ont été de 98 % dans les eaux potables, 85 % dans les eaux de surface et 84 % dans les eaux usées.

4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

Les échantillons doivent toujours être prélevés avec toutes les conditions d'asepsie nécessaires dans des contenants stériles de verre ou de polypropylène à large ouverture, de capacité d'environ 250 ml, en laissant un espace d'air d'au moins 2,5 cm.

De plus, les contenants utilisés pour le prélèvement des échantillons d'eau probablement chlorée doivent contenir une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dont la concentration finale est d'au moins 100 mg/l dans l'échantillon. Pour obtenir ce résultat, introduire 2,5 ml d'une solution de thiosulfate de sodium à 1 % (1 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ par 100 ml d'eau) dans un contenant de 250 ml avant de le stériliser. Le thiosulfate de sodium agit comme agent neutralisant du chlore résiduel qui pourrait être présent dans l'eau. Il empêche ainsi le chlore d'agir entre le moment du prélèvement et celui de l'analyse et permet donc d'obtenir une estimation juste du nombre de microorganismes présents dans l'eau au moment du prélèvement.

Par ailleurs, une étude réalisée dans nos laboratoires sur les eaux de consommation a permis d'établir que le délai maximal admissible pour l'analyse est de 48 heures après le prélèvement et que l'échantillon devait être protégé contre les effets de la température à l'aide d'un isolant thermique ou être réfrigéré pendant le transport.

À leur réception au laboratoire, les échantillons qui ne sont pas analysés dans les 4 heures qui suivent leur arrivée doivent être placés au réfrigérateur jusqu'au moment de leur analyse.

Les échantillons reçus congelés dans des contenants non conformes ou selon des délais de prélèvement inacceptables (> 48 heures) ne doivent pas être analysés.

5. APPAREILLAGE

- 5.1. Stérilisateur à rayons ultraviolets
- 5.2. Lampe ultraviolette 366 nm
- 5.3. Boîtes de Pétri d'environ 49 mm x 9 mm
- 5.4. Membranes filtrantes stériles quadrillées de porosité de 0,45 μm et de 47 mm de diamètre
- 5.5. Pincettes en acier inoxydable à bouts plats
- 5.6. Pipettes stériles de 10,0 ml et 1,0 ml de type TD
- 5.7. Thermomètre permettant une lecture à 0,1 $^{\circ}\text{C}$
- 5.8. Tubes à essais avec bouchon de 16 mm x 125 mm non fluorescents sous rayons ultraviolets
- 5.9. Fil à boucle
- 5.10. Stéréoscope
- 5.11. Autoclave
- 5.12. Bain-marie dont la température est ajustée à 44,5 $^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ $^{\circ}\text{C}$
- 5.13. Balance analytique avec une précision de 0,01 g

- 5.14. Rampe de filtration avec entonnoirs et supports de filtres
- 5.15. pH-mètre
- 5.16. Plaque chauffante agitatrice avec barre magnétique
- 5.17. Réfrigérateur maintenant une température entre 2 et 6 °C
- 5.18. Pompe à vide
- 5.19. Scelleur à sacs de polyéthylène
- 5.20. Sacs de polyéthylène
- 5.21. Flacons laveurs pour l'eau de rinçage
- 5.22. Bouteilles de 150 ml avec bouchon
- 5.23. Incubateur dont la température est ajustée à 35 °C ± 0,5 °C

6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S., à moins d'indication contraire. L'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture et des réactifs est de l'eau distillée, déminéralisée ou ultra-pure. Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

- 6.1. Acide rosolique, C₁₉H₁₄O₃ (CAS n° 603-45-2)
- 6.2. Hydroxyde de sodium, NaOH (CAS n° 1310-73-2)
Solution commerciale 10 N.
- 6.3. Acide chlorhydrique, HCl (CAS n° 7647-01-0)
Solution commerciale 1 N.
- 6.4. Phosphate de potassium anhydre KH₂PO₄ (CAS n° 7778-77-0)
- 6.5. Bandelettes pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase
Pathotec[®] cytochrome-oxydase, Remel[®].
- 6.6. Substrats chromogénique Colilert[®], format P/A 100 ml, Idexx Laboratories[®]

6.7. Solution d'hydroxyde de sodium 1 N

Ajouter 100 ml de la solution commerciale de NaOH 10 N (cf. 6.2) dans environ 700 ml d'eau et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à la température ambiante.

6.8. Solution d'hydroxyde de sodium 0,2 N

Ajouter 100 ml de la solution de NaOH 1 N (cf. 6.7) dans environ 300 ml d'eau et compléter à 500 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à la température ambiante.

6.9. Solution d'acide rosolique 1 % (P/V)

Peser 0,1 g d'acide rosolique (cf. 6.1) et le dissoudre dans 10 ml d'une solution de NaOH 0,2 N (cf. 6.8). Agiter jusqu'à dissolution complète. Préparer une solution fraîche chaque fois que le milieu m-Fc est préparé.

6.10. Gélose M-FC

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 52,0 g/l et sa formulation tel que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Tryptose	10,0 g
Protéose peptone n° 3 ou polypeptone	5,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Lactose	12,5 g
Sels biliaires n° 3 ou mélange équivalent	1,5 g
Bleu d'aniline	0,1 g
Agar	15,0 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 52,0 g de milieu déshydraté, ajouter 1 000 ml d'eau et porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Ajouter 10 ml d'une solution d'acide rosolique 1 % (P/V) (cf. 6.9) et laisser bouillir 1 minute. Le pH doit être de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.3) ou de NaOH 1 N (cf. 6.7). Ne pas autoclaver. Répartir en volumes de 4 ml dans des boîtes de Pétri de 49 mm x 9 mm et laisser solidifier.

Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant deux semaines au maximum.

6.11. Gélose infusion cœur-cervelle

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 52,0 g/l et sa formulation tel que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Infusion de cervelle de veau	200,0 g
Infusion de cœur de bœuf	250,0 g
Protéose peptone	10,0 g
Bacto dextrose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
Agar	15,0 g

NOTE - La gélose nutritive ou la gélose trypticase de soya peut aussi être utilisée comme milieux non sélectifs de propagation.

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 52,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante à feu moyen jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH doit être de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.3) ou de NaOH 1 N (cf. 6.7). Répartir environ 8 ml dans des tubes de 16 mm x 125 mm pour former des géloses inclinées. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant quatre semaines au maximum.

6.12. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de KH_2PO_4 anhydre (cf. 6.4) dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 avec une solution de NaOH 1 N (cf. 6.7) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

6.13. Eau tamponnée de rinçage

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.12) par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de polypropylène ou encore des flacons laveurs et autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes. L'eau tamponnée de rinçage se conserve deux mois à 4 °C.

6.14. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de 150 ml en volumes suffisants pour obtenir un volume final de $90 \text{ ml} \pm 2 \text{ ml}$ après autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. L'eau tamponnée de dilution se conserve deux mois à 4 °C.

6.15. Préparation des tubes de réactif Colilert[®]

Verser le contenu d'un sachet de réactif Colilert[®] (cf. 6.6) dans 100 ml d'eau stérile. Répartir en volume de 2 ml dans des tubes à essais stériles avec bouchon de 16 mm x 125 mm non fluorescents sous rayons ultraviolets. Ne pas autoclaver le réactif Colilert[®]. Ce réactif se conserve une semaine à 4 °C.

7. PROTOCOLE D'ANALYSE

Pour toute série d'échantillon, les recommandations des « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie », DR-12-SCA-02, sont suivies et tous les éléments de contrôle et d'assurance de la qualité nécessaires sont réalisés en conformité à ces lignes directrices.

Il est recommandé que tous les entonnoirs et supports de filtre soient lavés et stérilisés aux rayons ultraviolets après toute série d'analyses et interruption de travail supérieure à 15 minutes. La stérilisation aux rayons ultraviolets est obligatoire avant l'analyse de chaque échantillon d'eau.

Le lavage et la stérilisation à l'autoclave de l'équipement de filtration sont indispensables après l'analyse d'échantillons fortement contaminés (eaux de plages, lacs, eaux usées, etc.) et avant de poursuivre l'analyse sur des échantillons peu contaminés (eau de consommation).

L'absence de coliformes fécaux dans chaque entonnoir et support de filtre doit être vérifiée avant chaque série d'analyses d'eau. Procéder en rinçant la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ 20 ml à 30 ml d'eau de rinçage (cf. 6.13), filtrer sur une membrane stérile et incubé pendant 24 heures \pm 2 heures à $44,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ sur le milieu m-Fc. La fréquence de ce contrôle peut être augmentée lors de l'analyse d'eau fortement contaminée. En tout temps, les exigences prescrites par le DR-12-SCA-02 doivent être respectées. Dans le cas où les analyses demandées sont combinées (coliformes totaux et coliformes fécaux), le témoin de stérilité peut être fait avec le milieu de culture pour les coliformes totaux.

7.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Tous les échantillons d'eau ou les échantillons très liquides doivent être homogénéisés en agitant vigoureusement les bouteilles d'un mouvement vertical. Avant d'effectuer l'analyse, laisser reposer l'échantillon pendant 2 minutes afin de stabiliser le mélange de microorganismes.

En ce qui concerne les échantillons de sols, de déchets solides, de sédiments ou de boues, 10 grammes d'échantillon sont prélevés et mis en suspension dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (cf. 6.14) (dilution 1 : 10) avant de procéder à l'analyse.

Les échantillons soupçonnés d'être fortement contaminés (eaux usées, boues municipales ou industrielles, sédiments contaminés, fumiers, etc.) doivent être traités de façon à obtenir, pour un volume donné d'échantillon, entre 20 et 60 colonies sur la membrane et ainsi permettre une lecture juste et rapide du nombre de colonies.

Pour cela, des dilutions sériées sont effectuées de la façon suivante :

- en conditions aseptiques, pipetter 10 ml d'échantillon liquide dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (1 : 10) ou encore 10 ml de la dilution 1 : 10 d'un échantillon solide dans 90 ml d'eau tamponnée (1 : 100);
- bien agiter la bouteille d'eau tamponnée de dilution afin d'homogénéiser son contenu;

- répéter cette même opération jusqu'à l'obtention de la dilution désirée (1 : 100, 1 : 1 000, 1 : 10 000, etc.);
- changer de pipette entre chaque dilution.

7.2. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON

- Placer les entonnoirs et les supports dans le stérilisateur à rayons ultraviolets pendant 2 minutes.
- Mettre les supports et les entonnoirs sur la rampe de filtration.
- Mettre en fonction l'appareil à vide.
- Prendre une membrane filtrante stérile près du bord à l'aide d'une pincette stérilisée par flambage à l'alcool et la déposer ensuite sur le support de filtre.
- Placer l'entonnoir sur le support et le fixer fermement.
- Verser dans l'entonnoir les volumes requis, selon la nature de l'échantillon analysé (voir le tableau ci-dessous). Pour les volumes de 10 ml ou moins, introduire de 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage (*cf.* 6.13) dans l'entonnoir de filtration. Ensuite, prélever à l'aide d'une pipette stérile le volume désiré. Laisser couler l'échantillon en appuyant le bout de la pipette sur l'épaulement interne de l'entonnoir. Enlever la dernière goutte de la pipette à l'aide de la poire.

Provenance de l'eau	Volumes en ml
- Eaux potables traitées ou non traitées eaux souterraines (puits)	100 ml
- Eaux de surface (rivières, lacs, plages, etc.)	50, 10 et 1 ml
- Eaux usées domestiques, municipales, industrielles, etc. - Lixiviats de sites d'enfouissement sanitaire, etc.	10 et 1 ml de chacune des dilutions*
- Boues d'eaux usées industrielles, municipales, domestiques, etc. - Sols, déchets solides et sédiments contaminés	10 et 1 ml de chacune des dilutions effectuées à partir de la suspension dans l'eau tamponnée*

* : des volumes supérieurs ou inférieurs pourraient être filtrés, selon la turbidité de l'échantillon analysé.

- Faire le vide pour filtrer l'échantillon.
- Rincer au moins deux fois la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ 20 ml à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage stérile (utiliser un flacon laveur). Rincer davantage s'il y a possibilité de forte contamination.

- Retirer l'entonnoir et déposer la membrane filtrante à l'aide d'une pince stérile sur une gélose m-Fc (cf. 6.10).

NOTE - Déposer la membrane en la déroulant pour obtenir un contact étroit avec la gélose. La présence de bulles d'air est signalée par des taches blanches.

- Incrire sur la boîte de Pétri le numéro de l'échantillon et le volume filtré.
- Le plus rapidement possible après la filtration, placer les boîtes de Pétri dans des sacs en polyéthylène, les fermer avec le scelleur, puis les immerger complètement en position inversée dans un bain-marie à $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ pendant 24 heures \pm 2 heures. L'inversion des boîtes de Pétri empêche la condensation sur les membranes.

7.3. OBSERVATION DES RÉSULTATS

Après la période d'incubation, sortir et ranger les boîtes de Pétri par ordre de numéro d'échantillon. L'observation des membranes s'effectue le plus tôt possible après leur sortie de l'incubateur.

Choisir les membranes sur lesquelles il y a entre 20 et 60 colonies typiques et au maximum 200 colonies de toutes sortes. L'aspect caractéristique des colonies de coliformes fécaux sur la gélose m-Fc varie de bleu pâle à bleu foncé.

Si la lecture est difficile, effectuer les observations à l'aide d'un stéréoscope à pouvoir de grossissement 10 X à 15 X.

Incrire sur la feuille de travail le nombre de colonies typiques et atypiques correspondant au volume d'eau filtrée et reporter le résultat par 100 ml, tel que précisé à la section 8.

7.4. CONFIRMATION

La technique décrite précédemment est une méthode de dénombrement et d'identification présomptive des coliformes fécaux. Cette désignation signifie que les bactéries isolées sont reconnues comme la bactérie cible recherchée à l'aide d'une seule réaction biochimique caractéristique. Dans certains cas, il peut être souhaitable de vérifier que les coliformes fécaux mis en évidence à l'étape présomptive appartiennent à l'espèce *E. coli*.

Le degré de certitude avec lequel l'analyste doit préciser l'identification de la bactérie isolée détermine l'ampleur que prendra la confirmation. Elle peut être sommaire, indiquant l'appartenance ou non à l'espèce *E. coli* avec l'épreuve de l'oxydase, de l'ONPG et du MUG, ou aller à une identification plus complète à l'espèce à l'aide de systèmes d'identification biochimique (système API 20E[®], système BBL Crystal[®], système MicroScan[®], etc.).

Par souci de commodité, d'efficacité, de rapidité et de coût, nous privilégions la méthode de confirmation décrite ci-dessous et schématisée à la figure 1. Cette confirmation devrait être effectuée sur au moins 5 colonies suspectes ou selon un nombre de colonies évalué à 10 % des colonies présentes sur la membrane filtrante.

7.4.1. Propagation des souches suspectes

Prélever une colonie bien isolée sur la gélose m-Fc et effectuer une propagation de la souche par étalement sur gélose infusion cœur-cervelle inclinée (cf. 6.11). Placer dans un incubateur à 35,0 °C ± 0,5 °C pendant 18 à 24 heures.

7.4.2. Épreuve de la cytochrome-oxydase

À partir de la croissance présente sur la gélose de propagation, effectuer la détection de l'activité de la cytochrome-oxydase en faisant un frottis sur une bandelette pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase (cf. 6.5). *E. coli* ne possède pas l'enzyme cytochrome-oxydase et produit une réaction négative. Pour l'utilisation des bandelettes, voir les instructions du fabricant.

7.4.3. Épreuve de l'ONPG et du MUG (Colilert®)

Cette double épreuve combinée de l'ONPG et du MUG s'effectue à l'aide du réactif Colilert® (cf. 6.15).

Inoculer un tube de réactif Colilert® avec la croissance obtenue en 7.4.1 et placer le tube dans un incubateur à 35,0 °C ± 0,5 °C pendant 24 heures ± 2 heures.

Après ce délai, une coloration jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et confirme la présence de coliformes totaux ou de *E. coli*. En plus de la coloration jaune, une fluorescence observée à l'aide de la lampe ultraviolette indique la métabolisation du MUG et confirme la présence de *E. coli*. Il est cependant possible d'effectuer l'observation des tubes après 4 heures d'incubation. Si la réaction est négative, il faut poursuivre l'incubation jusqu'à 24 heures.

Un milieu incolore correspond à une réaction négative et confirme une colonie de bactéries non coliforme.

À la suite de la confirmation, les résultats peuvent être émis en termes de « coliformes fécaux confirmés » ou de « *Escherichia coli* ». Ces deux appellations sont considérés comme équivalentes.

7.4.4. Pourcentage de confirmation

Inscrire sur la feuille de travail le nombre et le pourcentage de colonies qui, selon la confirmation précédente, sont reconnues *E. coli*. Établir le pourcentage de confirmation comme suit :

$$\% \text{ de confirmation} = \frac{\text{Nombre de colonies confirmées}}{\text{Nombre de colonies testées}} \times 100$$

Exemple :

Si 5 colonies sur le milieu m-Fc ont été soumises aux étapes de confirmation et si 3 de ces colonies se sont révélées être des colonies de *E. coli*, le pourcentage de confirmation est le suivant :

$$\% \text{ de confirmation de l'échantillon} = \frac{3}{5} \times 100 = 60 \%$$

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1. ÉCHANTILLONS D'EAU POTABLE, D'EAU DE SURFACE ET D'EAUX USÉES

De façon générale, choisir la ou les membranes avec le nombre de colonies acceptables, de préférence à l'intérieur des limites de quantification, et exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par 100 ml d'échantillon, selon l'équation générale suivante :

$$UFC/100 \text{ ml} = \frac{\text{Nombre de colonies de coliformes fécaux}}{\text{Volume d'échantillon analysé en ml}} \times 100$$

Dans le cas où une confirmation est effectuée, il faut appliquer le pourcentage de confirmation (cf. 7.4.4) au résultat précédent :

$$UFC/100 \text{ ml confirmées} = UFC/100 \text{ ml présumées} \times \% \text{ de confirmation}$$

8.2. ÉCHANTILLONS SOLIDES (BOUES, SOLS ET DÉCHETS)

De façon générale, choisir la ou les membranes avec le nombre de colonies acceptables, de préférence à l'intérieur des limites de quantification, et exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par 100 g d'échantillon humide ou UFC par g d'échantillon humide, selon les équations générales suivantes :

$$UFC/g (\text{ poids humide }) = \frac{\text{Nombre de colonies de coliformes fécaux}}{\text{Poids de l'échantillon humide en grammes}}$$

$$UFC/100 \text{ g} (\text{ poids humide }) = \frac{\text{Nombre de colonies de coliformes fécaux}}{\text{Poids de l'échantillon humide en grammes}} \times 100$$

Le poids de l'échantillon analysé est déterminé de la façon suivante :

- la filtration de 1 ml de la dilution de 10 grammes d'échantillon dans 90 ml d'eau tampon correspond à 0,1 g d'échantillon analysé. Les dilutions sériées effectuées par la suite correspondent à 0,01 g, 0,001 g, 0,0001 g, etc. d'échantillon analysé.

Dans certains contextes réglementaires ou dans l'application de gestion par critère, il peut être nécessaire d'exprimer le résultat en fonction du poids sec de l'échantillon. Dans ce cas, le résultat se calcule comme suit :

$$\text{Résultat en UFC/g (poids sec) = } \frac{\text{Résultat en UFC/g (poids humide)}}{\% \text{ de matières sèches}}$$

Dans le cas où une confirmation est effectuée, il faut appliquer le pourcentage de confirmation (cf. 7.4.4) au résultat précédent :

$$\text{UFC/g (poids sec) confirmées} = \text{UFC/g (poids sec) présumées} \times \% \text{ de confirmation}$$

8.3. DÉNOMBREMENT À L'INTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

Calculer le résultat en ne retenant que les membranes sur lesquelles il y a de 20 à 60 colonies.

Exemples :

- 1) Si des volumes filtrés de 100 ml, 50 ml, 10 ml, 1 ml et 0,1 ml d'un échantillon produisent respectivement des dénombrements de 200, 110, 25, 4 et 1 colonies, choisir la membrane sur laquelle il y a 25 colonies (volume de 10 ml) et calculer le résultat à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{25}{10} \times 100 = 250 \text{ UFC/100 ml}$$

- 2) Si des volumes filtrés de 10,0 ml, 1,0 ml, 0,1 ml et 0,01 ml d'un échantillon produisent respectivement les résultats TNI, 55, 30 et 8 colonies, choisir les membranes sur lesquelles il y a 55 et 30 colonies (1,0 ml et 0,1 ml) :

$$\frac{55 + 30}{1,0 + 0,1} \times 100 = 7\,727 \text{ UFC/100 ml}$$

8.4. DÉNOMBREMENT À L'EXTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

8.4.1. Dénombrement lorsque le nombre de colonies isolées sur les membranes est inférieur à la limite de quantification

Additionner toutes les colonies sur l'ensemble des membranes, tout en tenant compte des volumes de l'échantillon ensemencés, et exprimer le résultat par 100 ml.

Exemples :

- 1) Si deux volumes filtrés de 50 ml d'un échantillon produisent respectivement 5 et 3 colonies :

$$\frac{5 + 3}{50 + 50} \times 100 = 8 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

- 2) Si des volumes filtrés de 50 ml, 10 ml et 1 ml d'un échantillon produisent respectivement 15, 4 et 0 colonies :

$$\frac{15 + 4 + 0}{50 + 10 + 1} \times 100 = 31 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

8.4.2. Dénombrement lorsque aucune colonie n'a été isolée sur les membranes correspondant à plusieurs volumes filtrés d'un échantillon

Calculer le résultat à l'aide du volume d'échantillon filtré le plus grand.

Exemple :

Si des volumes filtrés de 10 ml, 1 ml et 0,1 ml d'un échantillon produisent tous des dénombrements de 0 colonie, calculer le nombre de colonies par 100 ml qui aurait été rapporté s'il y avait eu 1 colonie sur la membrane du plus grand volume d'échantillon filtré :

$$\frac{1}{10} \times 100 = 10 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

$$< 10 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

8.4.3. Dénombrement lorsque tous les résultats de plusieurs volumes filtrés d'un échantillon sont au-delà de la limite supérieure de quantification

Calculer le résultat à l'aide de la limite de quantification et du plus faible volume d'échantillon utilisé.

Exemple :

Si des volumes de 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml produisent respectivement les résultats TNI, 150 et 110 colonies, tous ces dénombrements sont au-delà de la limite supérieure de quantification. Estimer le résultat à l'aide de la limite de quantification (60 pour les coliformes fécaux) et du plus faible volume d'échantillon filtré (0,01 ml) :

$$\frac{60}{0,01} \times 100 = 600\,000 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

> 600 000 UFC/100 ml

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les blancs d'entonnoir effectués au moment de l'analyse doivent démontrer l'absence de colonies de coliformes fécaux ou de tout autre microorganisme.

La température du bain-marie doit être maintenue à 44,5 °C ± 0,2 pendant toute la durée de l'incubation.

Toutes les exigences précisées dans le document DR-12-SCA-02, intitulé « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie », doivent être respectées.

10. BIBLIOGRAPHIE

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, 1998.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie, DR-12-SCA-02, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

Cinq colonies suspectes isolées sur gélose m-Fc

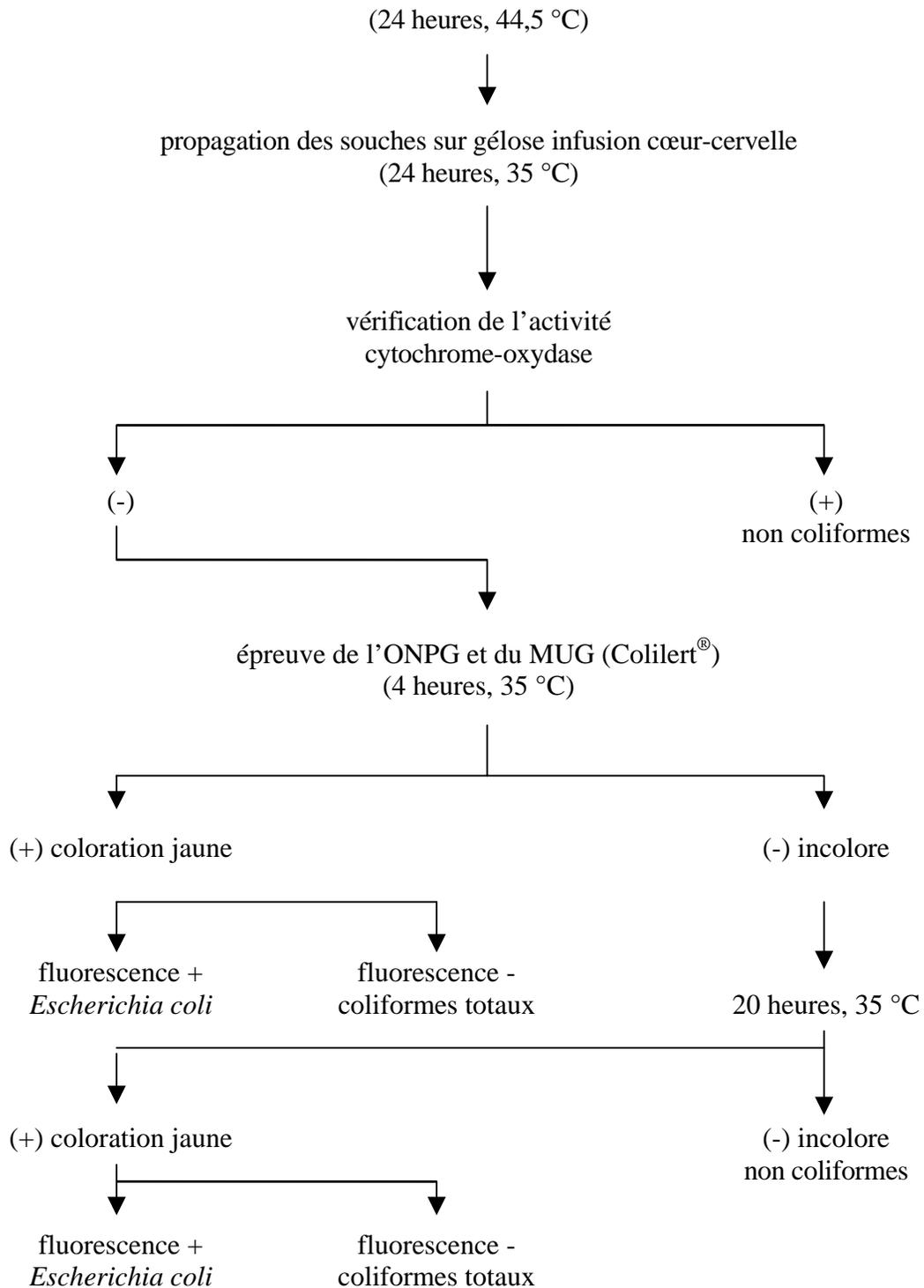


Figure 1 - Schéma du protocole de confirmation des colonies de coliformes fécaux à l'espèce *Escherichia coli*